家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析

安春菊，石　明，郝友进，盛长忠，耿　华，李德森，杜荣骞
（南开大学生命科学学院，天津　300071）

摘要：对家蝇 *Musca domestica* 3 龄幼虫进行针刺、带菌针刺、热激和超声 4 种处理，并于处理后不同时间分别收集提取家蝇幼虫体内耐热总蛋白，比浊法测定其抗菌活性，经逐步回归分析确定抗菌相关蛋白/多肽。结果表明，4 种处理均能诱导家蝇幼虫产生抗菌物质，其中表观分子量为 22 kD 的蛋白对藤黄微球菌和大肠杆菌均有抗菌作用，50 kD，13 kD，26 kD，7 kD 的蛋白抗菌活性具有专一性。还发现一种 37 kD 的蛋白对抗菌活性有负作用，推测它可能是促进细胞生长的物质。

关键词：家蝇；诱导；抗菌相关蛋白/多肽；抗菌活性
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2003）05-0545-04

Inducement and activity analysis of antibacterial-related proteins/peptides in housefly larvae

AN Chun-Ju, SHI Ming, HAO You-Jin, SHENG Chang-Zhong, GENG Hua, LI De-Sen, DU Rong-Qian (College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin　300071, China)

Abstract: Third-instar larvae of housefly (*Musca domestica*) were treated with different inducing methods including pricking, pricking with bacteria, heat shock, and ultrasonication, and collected at different times. The antibacterial activity was measured with liquid phase assay, and the antibacterial-related proteins/peptides were confirmed with stepwise regression model. The results showed that the above four treatments all could induce antibacterial substances. Among these induced proteins, X_{16} (22 kD) had activity against *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*, but X_2 (50 kD), X_{12} (26 kD), X_{22} (13 kD), X_{24} (7 kD) only had activity against either *M. luteus* or *E. coli*, and X_7 (37 kD) had negative effect on antibacterial activity, which was deduced to be factors that stimulated cell to grow rapidly.

Key words: *Musca domestica*; inducement; antibacterial-related proteins/peptides; antibacterial activity

昆虫抗菌肽具有分子量小、热稳定、水溶性好、抗菌谱广等特点（翟朝阳，1996），在细菌对已有抗生素耐药性逐渐增加而新的抗生素又很难发现的今天，其开发和应用前景十分广阔。家蝇 *Musca domestica* 具有极强的适应恶劣环境的能力，其防御机制是研究的热点之一。据王远程等（1997）报道，用大肠杆菌和超声波处理家蝇幼虫后，其体内产生一种与昆虫抗菌肽类似的碱性物质，该物质具有广谱的抗菌活性。

我们对家蝇 3 龄幼虫进行不同诱导，于不同时间收集后提取耐热总蛋白并进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析，用比浊法测定每份蛋白的抗菌活性，通过统计学逐步回归分析，筛选出家蝇幼虫体内与抗菌活性相关的耐热蛋白/多肽。

1　材料与方法

1.1　实验材料

家蝇由本实验室饲养。藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α，由南开大学生命科学学院菌种保管室提供。

1.2　抗菌物质的诱导

待家蝇幼虫生长至 3 龄时，采用以下 4 种方法进行诱导处理：用 6 号针头针刺腹部（记为 P），45℃热激 10 min（记为 H），45 kHz 50 W 超声处理 1 min（记为 U），针刺腹部后于菌液中浸泡 5 min

基金项目：天津市自然科学基金资助项目（033604911）
作者简介：安春菊，女，1977 年 3 月生，湖北襄樊人，博士，主要从事昆虫功能蛋白的分离纯化及相关基因克隆的研究，E-mail：jjuuaa@eyou.com
收稿日期 Received：2002-11-05；接受日期 Accepted：2003-01-27

（记为 PB）。未做诱导的记为 C。诱导后 6 h，16 h，24 h，48 h，65 h 收集上述 5 种处理各 1 g，沸水浴 5 min 后保存于 – 20℃中准备提取蛋白。依次记为 C_6，P_6，H_6，U_6，PB_6；C_{16}，P_{16}，H_{16}，U_{16}，PB_{16}；C_{24}，P_{24}，H_{24}，U_{24}，PB_{24}；C_{48}，P_{48}，H_{48}，U_{48}，PB_{48}；C_{65}，P_{65}，H_{65}，U_{65}，PB_{65}。

1.3　家蝇幼虫耐热总蛋白的提取

取收集的每份样品，参照王颖等（1999）的方法提取耐热总蛋白。

1.4　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

采用不连续体系（Sambrook *et al*.，1996），浓缩胶浓度为 3.75%，分离胶浓度为 15%，110 V 恒压电泳至指示剂进入分离胶后，以 220 V 恒压电泳至指示剂距胶底约 1 cm 时结束电泳。按照 Bradford（1976）的方法用考马斯亮兰 R250 染色。

染色后对凝胶用 Image Master VDS 系统（瑞士 Pharmacia Biotech 公司）进行扫描处理，得到各蛋白带的积分光密度值（IOD 值）。

1.5　抗菌活性测定

参照 Hultmark 等（1980）的方法测定每份样品对藤黄微球菌和大肠杆菌 DH5α 的抗菌活性。U（抗菌活性单位）= $(A_0 - A)/A_0$，其中 A_0 为对照在 570 nm 处的消光值。对每一种菌均重复测两次，对藤黄微球菌的抗菌活性记为 U_{m1} 和 U_{m2}，对大肠杆菌 DH5α 的抗菌活性记为 U_{e1} 和 U_{e2}。

1.6　统计学分析

计算蛋白带与抗菌活性及各蛋白带间的相关系数矩阵，以每条蛋白带的相对含量（用积分光密度表示）为自变量 X，以对藤黄微球菌的抗菌活性为因变量 Y_1，对大肠杆菌的抗菌活性为因变量 Y_2，用统计分析软件 SAS（Statistical Analysis System）6.12 版对实验数据在 0.10 水平上进行逐步回归分析（杜荣骞，1999）。所用的统计模型为：

$$Y_{n\cdot 1} = X_{n\cdot(k+1)}\beta_{(k+1)\cdot 1}\varepsilon_{n\cdot 1}$$

2　结果与分析

2.1　SDS-PAGE 结果

每份样品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1。从图中可以看出，在上样量完全相同的情况下，各泳道中某些条带颜色的深浅不完全相同。说明家蝇幼虫在不同诱导方式下，或同一诱导方式不同诱导时间下，同一种蛋白/多肽的表达量并不一样。因此，我们对胶中的各蛋白带进行 VDS 系统扫描得到各蛋白带的相对含量（用积分光密度表示），再对所得数据进行统计学分析以期筛选出家蝇幼虫应答外界刺激时产生与抗菌活性相关的蛋白/多肽。

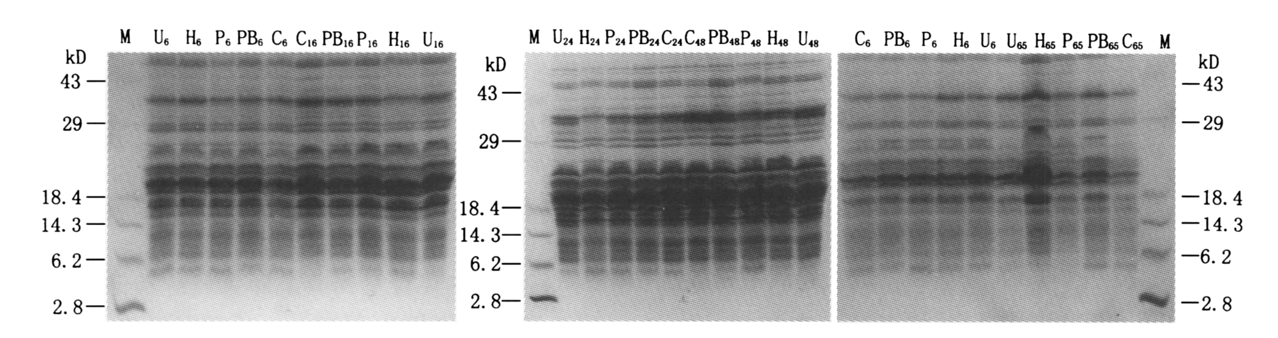


图 1　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1　The result of SDS-PAGE

2.2　比浊法测定抗菌活性

比浊法测得每份样品的抗菌活性结果见表 1，从表中可以看出，对家蝇幼虫进行不同处理，每种处理所诱导的蛋白/多肽的抗菌活性相关性上存在明显的差异，这种差异也表现在同一种诱导方式不同诱导时间的蛋白提取液上。另外，C_6，C_{16}，C_{24}，C_{48} 和 C_{65} 并没有进行特殊处理也表现出了相对较低的抗菌活性。故推测家蝇幼虫体内与抗菌活性相关的基因可能属于管家基因（house keeping gene），外源刺激只是加强这种基因的表达。这种推测也与家蝇在自然条件下携带大量致病菌而自身并不感病的免疫特征相符。

2.3　统计分析结果

经 Image Master VDS 系统分析，得到 25 种分子量小于 52 kD 的蛋白/多肽（$X_1 \sim X_{25}$）。从相关系数矩阵中可以看出各自变量间存在显著相关（相关系

数矩阵略)，因此单纯由自变量与因变量之间的简单相关不能筛选出与家蝇抗菌活性相关的蛋白/多肽。为此我们进行了逐步回归分析，在 0.10 水平上得到以下回归方程：

$$\hat{Y}_1 = 0.03684078 + 0.00021371X_2 - 0.00043349X_3 - 0.00015707X_7 + 0.00009827X_{16} + 0.00011982X_{22}$$

$$\hat{Y}_2 = 0.03127293 + 0.00025733X_4 - 0.00018355X_7 - 0.00019309X_{11} + 0.00014615X_{12} + 0.00016990X_{16} + 0.00004013X_{24} - 0.00044201X_{25}$$

结合 SDS-PAGE 的结果可以查得回归方程中所引入的 10 个自变量的表观分子量，连同上述回归方程的偏回归系数的显著性检验结果及相关蛋白带的抗菌活性情况列入表 2 中。

表 1　不同蛋白提取液的抗菌活性

Table 1　Antibacterial activities of different protein extracts

蛋白提取液 Protein extracts	U_{m1}	U_{m2}	U_{e1}	U_{e2}
C_6	0.0249	0.0019	0.0110	0.0051
PB_6	0.0622	0.0605	0.0183	0.0308
P_6	0.0871	0.0359	0.0147	0.0103
H_6	0.0332	0.0246	0.0147	0.0001
U_6	0.0373	0.0057	0.0440	0.0436
C_{16}	0.0270	0.0038	0.0000	0.0103
PB_{16}	0.0726	0.0624	0.0256	0.1000
P_{16}	0.0954	0.0397	0.0623	0.0667
H_{16}	0.0913	0.0132	0.0549	0.0590
U_{16}	0.0353	0.0170	0.0733	0.0872
C_{24}	0.0249	0.0076	0.0000	0.0128
PB_{24}	0.0664	0.0643	0.0293	0.1282
P_{24}	0.0747	0.0718	0.0403	0.0256
H_{24}	0.0602	0.0321	0.0806	0.0744
U_{24}	0.0436	0.0340	0.0293	0.0436
C_{48}	0.0228	0.0019	0.0000	0.0128
PB_{48}	0.0456	0.0359	0.0549	0.0923
P_{48}	0.0664	0.0302	0.0696	0.0641
H_{48}	0.0539	0.0227	0.0659	0.0769
U_{48}	0.0373	0.0321	0.0403	0.0513
C_{65}	0.0228	0.0076	0.0183	0.0103
PB_{65}	0.0747	0.0756	0.0293	0.0846
P_{65}	0.0622	0.0113	0.0842	0.0769
H_{65}	0.0187	0.0170	0.0586	0.0718
U_{65}	0.0290	0.0227	0.0110	0.0410

表 2　各蛋白带的表观分子量及抗菌活性

Table 2　The apparent molecular weight and the antibacterial activity of each protein band

蛋白带 Protein band	表观分子量 Apparent molecular weight (kD)	P 值 P value		显著性 Significance		作用方向 Action direction	
		藤黄微球菌 *M. luteus*	大肠杆菌 *E. coli*	藤黄微球菌 *M. luteus*	大肠杆菌 *E. coli*	藤黄微球菌 *M. luteus*	大肠杆菌 *E. coli*
X_2	50	0.0550		/		+	
X_3	48	0.0960		/		−	
X_4	47		0.0917		/		+
X_7	37	0.0261	0.0260	*	*	−	−
X_{11}	28		0.0880		/		−
X_{12}	26		0.0126		*		+
X_{16}	22	0.0887	0.0030	/	**	+	+
X_{22}	13	0.0439		*		+	
X_{24}	7		0.0460		*		+
X_{25}	5		0.0387		*		−

/：不显著 Not significant；*：显著 Significant；**：极显著 Extremely significant；+：正作用 Positive action；−：负作用 Negative action

3 讨论

从逐步回归分析的结果中可以看出，引入到两个回归方程中的自变量既有相同的，也有不同的，且相同自变量对各个因变量的作用显著程度是不同的。除 X_7 和 X_{16} 对藤黄微球菌和大肠杆菌均有抗菌活性外，X_2，X_3 和 X_{22} 对藤黄微球菌有活性而对大肠杆菌无活性，X_4，X_{11}，X_{12}，X_{24} 和 X_{25} 对大肠杆菌有活性而对藤黄微球菌无活性（如表 2 所示）。说明家蝇幼虫经过诱导后，会有多种与抗菌活性相关的蛋白/多肽开始表达或加强表达。这些蛋白/多肽的抗菌活性不完全相同，有的具有广谱性，有的具有专一性。它们彼此合作，共同建立一个完整的防御系统。

上述回归方程所引入的自变量中，X_{22} 与溶菌酶的表观分子量（14.3 kD）接近，溶菌酶通过水解细菌细胞壁肽聚糖层中多糖骨架的β-1,4 糖苷键而破坏其细胞壁，导致细菌因渗透压失控而死亡。由于 G^+ 菌与 G^- 菌的细胞壁组成有显著差异，通常认为溶菌酶仅对 G^+ 菌有杀菌作用。从表 2 可以看出，X_{22} 对藤黄微球菌（G^+）有显著活性，而对大肠杆菌（G^-）无活性。翟朝阳（1996）也曾报道昆虫经微生物的感染后能产生一些防御性物质，包括抗菌蛋白/多肽、溶菌酶和其他一些具有抗菌活性的物质。故推测 X_{22} 可能为溶菌酶。

从上述回归方程中还可以看出，有的自变量的偏回归系数是正值，说明该自变量与抗菌活性正相关，它们在家蝇幼虫防御外界感染中具有重要的作用。有的自变量的偏回归系数是负值，说明该自变量对抗菌活性有负作用，表明该蛋白/多肽不仅无抗菌活性，反而会促进细菌的生长，该蛋白/多肽可能是一种促进细胞生长的物质。它们出现的可能原因是：在对家蝇幼虫进行针刺、热激和超声处理时，不仅与抗菌活性相关的基因会加强表达，而且体内一系列相关防御体系也会开始表达。家蝇幼虫在处理过程中受到了伤害，在诱导下所作的首要反应是促进新的细胞生长，消除外界刺激所造成的损伤，于是表达出对抗菌活性有负作用的蛋白/多肽。据 Emilia 等（1988）报道，在非洲爪蟾 *Xenopus* 的皮肤、肠、脑中发现一种活性肽，在伤口愈合和治疗炎症方面有作用，可能是加速了创伤处细胞的分裂增殖。这种活性肽与我们发现的对抗菌活性有负作用的蛋白/多肽两者之间是否有相似之处，正在进一步研究。

参 考 文 献（References）

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.

Du R Q, 1999. Biostatistics. Beijing: Higher Education Press; Heidelberg: Spring-Verlag Press. 177 - 251.［杜荣骞，1999. 生物统计学. 北京：高等教育出版社；海德堡：施普林格出版社. 177 - 251］

Emilia S, Giuseppe M, Michael Z, 1988. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.*, 228 (2): 337 - 340.

Hultmark D, Striner H, Rasmuson T, Boman H, 1980. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 106 (1): 7 - 16.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatism T (Translated by Jin D Y, Li M F, Hou Y D), 1996. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) in Chinese. Beijing: Science Press. 880 - 885.［Sambrook J, Fritsch E, Maniatism T（金冬雁，黎孟枫，侯云德译），1996. 分子克隆实验指南（第二版）. 北京：科学出版社. 880 - 885］

Wang Y, Du R Q, Zhao S R, 1999. Studies on relation between salt-tolerance and specific proteins expressed under salt stress in *Sorghum* (*Sorghum vulgare* Pers.). *Acta Agronomica Sinica*, 25 (1): 76 - 81.［王颖，杜荣骞，赵素然，1999. 高粱在盐胁迫下特定蛋白的表达及与耐盐性关系的研究. 作物学报，25（1）：76 - 81］

Wang Y C, Zuo X F, Sun D X, Chen J X, Guan Z H, 1997. The constitute and physical and chemical quality of antibacterial substances in housefly larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 37 (2): 148 - 153.［王远程，左晓峰，孙东旭，陈建新，管致和，1997. 家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质. 微生物学报，37（2）：148 - 153］

Zhai C Y, 1996. The progress of studies on insect antibacterial proteins. *Acta Entomologica Sinica*, 39 (1): 99 - 104.［翟朝阳，1996. 昆虫抗菌物质研究进展. 昆虫学报，39（1）：99 - 104］